Ueber den

Einfluss des Nährstoffgehaltes der Nährböden auf die Raschheit der Sporenbildung und die Zahl und Resistenz der gebildeten Sporen.

Akademische Dissertation

verfasst und der

medicinischen Facultät der Universität Würzburg

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Medicin, Chirurgie und Geburtshilfe

vorgelegt von

Philopimin Stephanidis

aus Trapezunt.

München.

Druck von R. Oldenbourg.

1899.

Ueber den

Einfluss des Nährstoffgehaltes der Nährböden auf die Raschheit der Sporenbildung und die Zahl und Resistenz der gebildeten Sporen.

Akademische Dissertation

verfasst und der

medicinischen Facultät der Universität Würzburg

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Medicin, Chirurgie und Geburtshilfe

vorgelegt von

Philopimin Stephanidis

aus Trapezunt.

ACAD.
LUGD.BAT.
BIBL.

München.

Druck von R. Oldenbourg.

1899.

Referent: Herr Prof. Dr. K. B. Lehmann.

ΤΟΙΣ

ΚΑΣΙΓΝΗΤΟΙΣ ΕΜΟΙΣ ΦΙΛΤΑΤΟΙΣ

ΣΤΕΦΑΝΩΙ ΚΑΙ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΙ

ΧΑΡΙΝ ΤΗΝ ΜΕΓΙΣΤΗΝ ΕΙΔΩΣ

ΦΙΛΟΠΟΙΜΗΝ Γ. ΣΤΕΦΑΝΙΔΗΣ.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549806_0125

Ueber den Einfluss des Nährstoffgehaltes von Nährböden auf die Raschheit der Sporenbildung und die Zahl und Resistenz der gebildeten Sporen.

Von

Dr. **Philopimin Stephanidis,**

aus Trapezunt.

(Aus dem hygienischen Institut zu Würzburg.)

Im Würzburger hygienischen Institut hat 1890 Osborne unter Leitung von Herrn Professor K. B. Lehmann (Arch. f. Hyg., XI, 51) bewiesen, dass:

1. die absolute Grösse der Sporenernte bei gleicher Aussaat auf Nährböden von geringem Fleischextractgehalt geringer ist als auf solchen von normalem Gehalt;
2. auf erschöpften Nährböden die absolute Sporenernte ebenfalls geringer ist als auf guten;
3. dass — hierüber sind allerdings nur einige gelegentliche Beobachtungen und keine Zahlen mitgetheilt — in den spärlich gewachsenen Fäden der schlechten Nährböden die Sporen weniger dicht gelegen haben als in den üppig gewachsenen Fäden der guten Nährböden — und dass also von einer Begünstigung der Sporenbildung durch Nährböden, deren Erschöpfung früher eintritt, keine Rede sein kann.

Nimmt man das Wort Begünstigung in dem Sinne, wie es Osborne gemeint, d. h. dass die absolute Menge und wohl auch die relative Dichtigkeit der Sporen auf guten Nährböden grösser ist als auf schlechten, so ist gegen Osborne's Ausspruch nichts

einzuwenden, denn er hat 1 und 2 streng bewiesen und 3 wenigstens wahrscheinlich gemacht.

Die Hauptresultate der Arbeit wurden von Herrn Professor Lehmann in der physikalisch-medicinischen Gesellschaft zu Würzburg kurz mitgetheilt, und von demselben die Versuche in Gegensatz zu einer Ansicht von Buchner gebracht, welche nach Lehmann darin bestehen sollte, »dass eine gewisse Erschöpfung des Nährbodens bedingend oder wenigstens begünstigend für die Sporenbildung sei«.

In einer Erwiderung wies Buchner[1]) darauf hin, dass Lehmann (was in der That der Fall war) den einzigen Satz, in dem er seine Ansicht ausgesprochen hatte, nicht im Wortlaut gekannt haben könne. Derselbe lautet: »Die physiologische Ursache der Sporenbildung liegt in dem eintretenden Mangel an Ernährungsmaterial.« Diesen Satz, gegen den Lehmann nirgends aufgetreten war, stützte Buchner durch drei Versuche.

Erstens stellte er fest, dass die Sporenbildung ausblieb, wenn man in einem Schälchen mit 2 ccm Bouillon dieselbe um die üppig wachsenden Bacillen häufig erneute, dass sie aber bald eintrat, wenn man die gleichen Bacillen in einem Tropfen Bouillon züchtete.

Zweitens zeigte er, dass in sterilisirtes Wasser gebrachte Milzbrandfäden weiter Sporen bilden, während dieselben in angefaulter Fleischflüssigkeit es nicht thun, und drittens, dass in 1 proc. Fleischextractlösung nach 18 Stunden bei 36,5° noch keine Sporen gebildet waren, während in 0,2 proc. Lösung Sporenbildung eingetreten war. Er schloss aus diesen Versuchen, dass in verdünnten Lösungen rascher Sporenbildung eintrete.

Ausserdem meint Buchner in dieser Arbeit, es sei wichtig, wie sich die Intensität der Sporenbildung auf verschiedenen Nährböden verhielte, resp. wie sich die Zahl der Sporen zur Zahl der Stäbchen stelle.

Da ausser Buchner's angeführten wenigen Versuchen über den zeitlichen Verlauf der Sporenbildung auf verschiedenen

1) Centralbl. f. Bact., VIII, 1.

Nährböden[1]) nichts Näheres bekannt geworden ist, und es lohnend erschien, die gelegentlichen Resultate Osborne's über die relative Intensität der Sporenbildung weiter zu verfolgen, so veranlasste mich Herr Professor Lehmann, folgende zwei Fragen gleichzeitig zu untersuchen:

1. Wie verhält sich die Raschheit und die Dichtigkeit (Intensität) der Sporenbildung auf Nährböden verschiedenen Gehaltes an Nährstoffen?
2. Wie ist unter diesen Umständen die Qualität, d. h. Resistenz der Sporen gegen Schädlichkeit?

I. Ueber die Raschheit und Dichtigkeit der Sporenbildung auf verschieden reichen Nährböden.

Es sollte die Bildung der Milzbrandsporen beobachtet werden auf Nährböden mit wechselndem Gehalt an Nährsubstanz; ich benützte dazu Agarnährböden von verschiedenem Gehalt an Fleischextract, ähnlich wie Osborne, und zwar verwendete ich Wasseragar mit 1 bis $^1/_{50}\%$ Fleischextract. Auf all' diesen Nährböden habe ich stets Wachsthum beobachtet, auf den concentrirteren Böden war das Wachsthum wesentlich üppiger als auf den verdünnten, bei der Concentration $^1/_{50}$ nur sehr zart dentritisch. Die Impfung geschah stets in ca. 4 Strichen. Die Temperatur war 37°. Niemals blieb auf einem der Nährböden die Sporenbildung aus. Die Resultate stellte ich, um übersichtlich zu sein, in 3 Tabellen zusammen, die sich nur dadurch unterscheiden, dass sie über Versuche mit verschiedenem Fleischextractgehalt berichten. Im übrigen ergänzen sich die Versuche der 3 Tabellen.

---

1) Vgl. auch die Arbeit von Oswald-Schreiber. Derselbe bringt über die Intensität der Sporenbildung keine Versuche, dagegen hat derselbe in einer grossen Reihe an die Versuchsanordnung von Buchner sich anschliessender Experimente in vollem Einklang mit Buchner die enorme Beschleunigung der Sporenbildung nachgewiesen durch plötzliche Versetzung älterer, ja sogar ganz junger gut ernährter Milzbrandfäden in Wasser oder Salzlösungen. Er schliesst, dass ein Mittel um so rascher Sporenbildung hervorrufe, je rascher es das Wachsthum hemmt, ohne sonst zu schaden.

Die Tabellen geben an:

1. Nach welcher Zeit reife resp. halbreife Sporen beobachtet wurden. Selbstverständlich hat die Sporenbildung in einzelnen Fällen wohl schon etwas früher stattgefunden, als sie beobachtet wurde.
2. Unter der Rubrik »Dichtigkeit« wie viel Sporen auf eine Fadenstrecke von unter Anwendung von Leiz $^1/_{12}$ Immersion im ungefärbten Präparat gezählt werden konnten. Es wurden jedesmal etwa 10 bis 20 Strecken sorgfältig gezählt und zwar Strecken, die den Eindruck machten, als ob die Sporulation hier der durchschnittlichen Sporendichtigkeit des Präparats etwa entspreche. Fäden (z. B. aus den Randpartien), die keine Sporen enthielten, wurden nie zur Verwendung der Durchschnittswerthe herangezogen. Wir verhehlen uns nicht, dass die Methode nicht frei von Willkürlichkeiten ist, nichtsdestoweniger dürften die mit möglichster Objectivität gewonnenen zahlreichen Resultate doch einen sicheren Schluss gestatten.

Tabelle I.

Versuch	In Stunden	$^1/_2$ % Fleischextract		$^1/_5$ % Fleischextract		$^1/_{10}$ % Fleischextract		$^1/_{50}$ % Fleischextract	
		Qualität	Dichtigkeit	Qualität	Dichtigkeit	Qualität	Dichtigkeit	Qualität	Dichtigkeit
I	15	halbreife Sp.	—	reife Sp.	32	reife Sp.	—	reife Sp.	27
	35	reife Sp.	80	reife Sp.	70	reife Sp.	60	reife Sp.	50
II	16	halbreife Sp.	40	reife Sp.	25	reife Sp.	22	—	—
	36	reife Sp.	45	reife Sp.	30	reife Sp	31	—	—
III	16	unreife Sp.	—	halbreife Sp.	—	reife Sp.	40	reife Sp.	30
IV	15	halbreife Sp.	—	reife Sp.	—	—	—	—	—
	35	reife Sp.	—	reife Sp. u. freilieg. Sp.	—	—	—	—	—
V	20	reife Sp.	48	reife Sp.	30	—	—	—	—
VI	17	halbreife Sp.	34	—	—	—	—	reife Sp.	25

Versuch	In Stunden	$^1/_2$ % Fleischextract		$^1/_5$ % Fleischextract		$^1/_{10}$ % Fleischextract		$^1/_{50}$ % Fleischextract	
		Qualität	Dichtigkeit	Qualität	Dichtigkeit	Qualität	Dichtigkeit	Qualität	Dichtigkeit
VI	41	freilieg. Sp. u. Fäden	—	—	—	—	—	nur freilieg. Sp.	—
VII	15	halbreife Sp.	—	reife Sp.	20	—	—	—	—
VIII	15	halbreife Sp.	—	—	—	reife Sp.	25	reife Sp.	20
IX	20	reife Sp.	45	—	—	—	—	reife Sp. u. freilieg.	25
X	14	unreife Sp.	—	halbreife Sp.	25	reife Sp.	25	—	—
	32	reife Sp.	45	—	—	—	—	—	—
XII	14	—	—	halbreife Sp.	—	reife Sp.	—	—	—

Tabelle II.

Versuch	In Stunden	1 % Fleischextract		$^1/_{10}$ % Fleischextract	
		Qualität	Dichtigkeit	Qualität	Dichtigkeit
XIII	15	unreife Sp.	—	reife Sp.	—
XIV	16	halbreife Sp.	25	reife Sp.	15
XV	47	reife Sp.	48	reife u. freilieg. Sp.	30
XVI	15	halbreife Sp.	30	reife Sp.	20
XVII	15	halbreife Sp.	—	reife Sp.	22
XVIII	14	halbreife Sp.	—	reife Sp.	—
	38	reife Sp.	50	meistens freilieg. Sp.	—
XIX	14	unreife Sp.	—	reife Sp.	25

Tabelle III.

XX. Versuch	5 % Fleischextract	1 %	$^1/_2$ %	$^1/_5$ %	$^1/_{20}$ %	$^1/_{40}$ %	$^1/_{100}$ %	$^1/_{500}$ %	% %
In 15 Stunden	keine Sp.	unreife Sp.	halbreife Sp.	reife Sp.	reife Sp.	prachtvolle reife Sp	reife Sp.	Prostadien (Punkte)	Fädenbildung
In 35 Stunden	Sporenbildung	—	—	—	—	—	freilieg Sp.	—	—

Ergebnisse der Versuche.

Aus den Tabellen leiten sich folgende Sätze ab:

1. Je besser der Nährboden, um so rascher ceteris paribus die Sporenbildung. Dieses Ergebnis stimmt vollkommen mit Buchner's Anschauungen. Bei $^1/_{50}$ und $^1/_{10}$ waren die Sporen nach 14 Stunden reif (früher wurde nicht untersucht, auf $^1/_5$ sind nach 15 Stunden mehrfach reife Sporen beobachtet, auf $^1/_2$ nie nach 16 Stunden, nicht vor 20 Stunden; allerdings habe ich keine Beobachtungen zwischen 17 und 20 Stunden, überhaupt genügen meine Beobachtungen noch nicht völlig zur Feststellung der Grösse der Differenz.
2. Die Dichtigkeit oder Intensität der Sporenbildung ist auf den guten Nährböden eine grössere als auf den schlechten. Sehr beträchtlich ist die Differenz nicht; immerhin liefern, wie zu erwarten, die kräftigen Fäden, die auf dem reichen Nährboden erwachsen sind, die reichere Ernte. Diese Beobachtung stimmt mit den gelegentlichen Beobachtungen von Osborne. (a. a. O.)

Während ich alle die citirten Versuche mit Aussaat von Sporenmaterial machte, das ich 10 bis 15 Minuten auf 75° erhitzte, habe ich, durch eine zufällige Beobachtung veranlasst, auch einige Versuche mit Aussaat sporenfreier Fäden angestellt. Das Resultat war Sporenbildung bei 37° bei $^1/_{10}$ Agar in 8 Stunden, d. h. ca. 6 Stunden früher als bei Aussaat von Sporen.

Aus der Arbeit von Schreiber geht hervor, dass auch dieser Autor beobachtet hat, dass die Sporen zur Keimung etwa 4 Stunden brauchen, bis sie zu Fäden auswachsen. Es stimmt dieses Ergebnis recht gut zu meinem Befund.

II. Die Resistenz der Sporen, welche auf verschieden reichen Nährböden gebildet sind.

Die Thatsache, dass die Sporen auf schlechten Nährböden schneller als auf guten erwachsen, dass sie aber in Dichtigkeit zurückstehen, legt uns die Frage nahe: sind vielleicht die erwähnten Sporen in ihren biologischen Eigenschaften verschieden?

Um dieselben hierauf zu untersuchen, schien es mir angezeigt, ganz speciell die Resistenz gegen Hitze in's Auge zu fassen.

Ich arbeitete — unter Umgehung aller Austrocknungsmethoden — auf Vorschlag von Herrn Professor Dr. K. B. Lehmann ausschliesslich mit wässrigen Sporenemulsionen, die ich mir durch langes Schütteln einer oder zweier Oesen des Culturrasens von einer 48stündigen Cultur in 10 ccm Wasser verschaffte. Durch 15 Minuten langes Erwärmen der so hergestellten Emulsion auf 70° befreite ich sie von Fäden und ganz unreifen Sporen.

Es wurde stets verglichen die Resistenz der Sporen von zwei gleichzeitig angelegten, mit dem gleichen Material geimpften, neben einander im Brutschrank von 37° aufbewahrten Culturen, zu denen einmal 1% Agar, einmal 1/10 proc. Agar gedient hatte.

Die so erhaltenen Emulsionen waren natürlich nicht jedesmal von gleichem Sporengehalt, was nichts schadete, da es sich ja nur um die procentische Verminderung der Sporen durch das Erhitzen handelte.

Von jedem Stammröhrchen mit Sporenemulsion gab ich in je 5 Röhrchen, welche je 4 ccm sterilisirtes Wasser enthielten, 1 ccm. Von der verdünnten Emulsion wurden dann Zählplatten mit je 1 ccm und 1/2 ccm gegossen. Es wurden dabei stets für jede neue Emulsion eine neue Pipette verwendet. Um das Abpipettiren der Sporenemulsionen gefahrlos vorzunehmen, schaltete ich zwischen Pipette und Saugschlauch eine mit conc. Schwefelsäure gefüllte Wulff'sche Flasche ein. Besondere Sorgfalt wurde darauf verwendet, die Emulsionen während des Abpipettirens stets zu schütteln, um eine gleichmässige Vertheilung der Keime zu bekommen.

Von den 5 Röhrchen mit verdünnter Sporenemulsion, die ich von jeder der beiden Sporenarten erhielt, liess ich eines unerwärmt (kalte Probe), die vier anderen stellte ich in den kochenden Dampftopf für 4, 7, 12 und 17 Minuten. Wie mir besondere Versuche zeigten, dauert es zwei Minuten, bis 5 ccm Wasser in

einem Reagenzglas in unserem Dampftopf die Maximaltemperatur von 99° erreichen, es waren also die Proben: 2, 5, 10, 15 Minuten auf die Siedetemperatur des Wassers in Würzburg erhitzt. Versuche, im Wasserbad oder Paraffinbad das Erhitzen vorzunehmen, scheiterten an dem starken Verdampfen des Wassers aus dem Röhrchen.

Sowie die Röhrchen die beabsichtigte Zeit erhitzt waren, wurden sie in kaltem Wasser abgekühlt und unmittelbar darauf zu Platten verwendet. Die Platten wurden nach 15 Stunden Wachsthum bei Bruttemperatur mit der Lupe gezählt, eine nennenswerthe Zunahme der Colonien fand dann nicht mehr statt.

Die Resultate der vielfachen Versuche gebe ich wieder in Form einer kurzen Tabelle; die eingesetzten Zahlen sind je Mittelzahlen aus den Versuchen mit $^1/_2$ ccm und 1 ccm.

(Tabelle IV und V siehe Seite 13.)

Als Resultat meiner Tabellen kann ich nur angeben:

Auf $^1/_{10}$ und $^1/_1$ Agarnährböden werden Sporen gebildet, deren Resistenz gegen Hitze nicht wesentlich verschieden ist. Bald sind die Sporen auf dem einen, bald auf dem anderen Nährboden etwas resistenter. Dagegen bestehen von Versuch zu Versuch grosse, zur Zeit noch nicht aufgeklärte Resistenzverschiedenheiten, stets aber waren auf beiden Nährböden die Sporen entweder auffallend gut oder auffallend wenig resistent. Den interessanten Ursachen dieser Differenzen wird durch besondere Untersuchungen nachzuspüren sein.

Meine Resultate fasse ich in dem Satze zusammen: Die Raschheit der Sporenbildung ist auf schlechteren Nährböden, auf denen das Wachsthum kümmerlich ist, eine grössere. Die Sporen liegen aber auf den guten Nährböden dichter, gute Ernährung der Fäden begünstigt also nicht nur die absolute, sondern auch die relative Sporenernte. Die Qualität der auf den guten und schlechten Nährböden gebildeten Sporen ist nicht wesentlich verschieden.

Tabelle IV.

Erhitzungsdauer	I. Versuch				II. Versuch				III. Versuch				IV. Versuch				V. Versuch			
	1 %		1/10 %		1 %		1/10 %		1 %		1/10 %		1 %		1/10 %		1 %		1/10 %	
	1 ccm	2×1/2 ccm	1 ccm	2×1/2 ccm	1 ccm	2×1/2 ccm	1 ccm	2×1/2 ccm	1 ccm	2×1/2 ccm	1 ccm	2×1/2 ccm	1 ccm	2×1/2 ccm	1 ccm	2×1/2 ccm	1 ccm	2×1/2 ccm	1 ccm	2×1/2 ccm
kalt	4536	5418	2672	3232	9840	12 370	24 680	35 200	8568	10 450	6005	9072	3150	3906	2835	3110	18 306	14 122	21 654	28 590
2′	51	52	72	64	325	404	573	664	0	0	0	0	0	0	0	0	408	580	604	464
5′	26	82	85	94	516	440	268	376	0	0	0	0								
10′	21	28	11	16	317	440	315	314	0	0	0	0	0	0	0	0	42	14	35	54
15′	11	16	20	18	283	206	126	202	0	0	0	0								

Erhitzungsdauer	VI. Versuch		VII. Versuch		VIII. Versuch		IX. Versuch		X. Versuch		XI. Versuch	
	1 %	1/10 %	1 %	1/10 %	1 %	1/10 %	1 %	1/10 %	1 %	1/10 %	1 %	1/10 %
	1 ccm		1 ccm		1 ccm		1 ccm		1 ccm		1 ccm	
kalt	18 960	24 570	16 065	38 288	5 425	9 002	11 035	7 305	17 060	9 513	1 835	2 087
2′	9 090	14 111	7 560	22 428	605	503	206	261				
10′	9	2	48	8	45	32	88	55	3 150	1 250	630	1 820

Tabelle V.

Von 1000 Sporen der kalten Platten blieben erhalten Keime:

Erhitzungsdauer	Im I. Versuch		Im II. Vers.		Im III. Vers.		Im IV. Vers.		Im V. Vers.		Im VI. Vers.		Im VII. Vers.		Im VIII. Vers.		Im IX. Vers.		Im X. Vers.		Im XI. Vers.	
	1%	1/10%	1%	1/10%	1%	1/10%	1%	1/10%	1%	1/10%	1%	1/10%	1%	1/10%	1%	1/10%	1%	1/10%	1%	1/10%	1%	1/10%
Bei 2′	10	21	17	10	0	0	0	0	30	12	480	564	450	700	120	55	19	38				
» 5′	11	30	32	5	0	0																
» 10′	5	4	17	5	0	0	0	0	2	3	0,5	0	3	0,2	9	3	8	8	185	140	341	310
» 15′	2,5	7	11	3	0	0																

Zum Schlusse spreche ich Herrn Professor Dr. K. B. Lehmann für die Ueberlassung des Themas und seine fortgesetzte Unterstützung mit Rath und That bei der Durchführung desselben meinen Dank aus; auch Herrn Assistenten Dr. Appel, der mich bei der Ausführung der einzelnen Versuche vielfach unterstützte und controlirte, bin ich zu Dank verpflichtet.